

483,588
attach
Paper
w

TRANSLATION FROM GERMAN

World Intellectual Property Organization

World Patent Office

International Application Published in Accordance with Patent Cooperation Treaty (PCT)

- (51) Int. Cl⁶: C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/577, 33/574
- (11) Published International Application No. **WO 98/52975**
- (43) Disclosure Date: November 26, 1998

- (21) International Application No.: PCT/DE98/01409
- (22) International Application Date: May 22, 1997
- (30) Priority Right Data: Application No. 197 21 700.1, May 23, 1997, Germany
- (71) Applicant (for all designated countries except U.S.A.): Deutsches
Krebsforschungszentrum Stiftung des Offentlichen Rechts, Heidelberg, Germany
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for U.S.A. only): Melvyn Little, Neckargemund, Germany;
Sergey Kipriyanov, Heidelberg, Germany; Gerhard Moldenhauer, Heidelberg,
Germany
- (74) Agent: Bernard Huber, Huber & Schussler, Munich
- (81) Designated Countries: JP, US, European Patents (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE.

Published:

With International Search Report

Before deadline permitted for amendments. Republished if amendments are submitted.

(54) Title: **Mutated OKT3 Antibody**

(57) Abstract

The invention relates to an H100A position point-mutated OKT3 antibody, and to a method for the production and use thereof.

ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia-Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Ivory Coast	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

HV region
Mutated OKT3 Antibody

The present invention concerns OKT3 antibodies mutated by a point mutation at position H100A, methods for their production and their use.

OKT3 is a monoclonal antibody of the IgG 2a type originating from the mouse that recognizes an epitope of an ϵ -subunit of the human CD3 complex (Kung et al., Science **206**, pp. 347-349 (1979); Van Wauwe et al., J. Immunol. **124**, pp. 2708-2713 (1980); Transy et al., Eur. J. Immunol. **19**, pp. 947-950 (1989)). The method for obtaining the monoclonal antibody from the corresponding hybridoma is described in detail in these documents. Moreover, the OKT3-producing hybridoma cell line was entered on April 26, 1979 under ATCC number CRL 8001 in the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 by the holder of EP Patent 0 018 795. OKT3 has since been used to suppress a T-cell response and in so doing prevent rejection of transplants (Thistlethwaite et al., Transplantation **38**, pp. 695-701 (1984); Woodle et al., Transplantation **51**, pp. 1207-1212 (1991)). On the other hand, T-cell activation and proliferation can also be triggered by OKT3, stimulating effector cells, which can be used in adoptive cancer immunotherapy (Yannely et al., J. Immunol. Meth. **1**, pp. 91-100 (1990)). OKT3 was used both alone and as a component of a bispecific antibody in order to direct cytotoxic T-lymphocytes against tumor cells or virus-infected cells (Nitta et al., Lancet **335**, pp. 368-376 (1990); Sanna et al., Bio/Technology **13**, pp. 1221-1224 (1995)). In addition, humanized versions of the OKT3 monoclonal antibodies that were expressed in COS cells are also known (Woodle et al., J. Immunol. **148**, pp. 2756-2763 (1992); Adair et al., Human Antibod. Hybridomas, pp. 41-47 (1994)). However, thus far there has been the problem that OKT3 does not exhibit sufficient stability and cannot be expressed stably or in sufficient amounts in known recombinant expression systems.

The task of the present invention was therefore to express OKT3 in recombinant fashion and obtain an antibody having satisfactory stability.

The task is solved by the object of the patent claims.

h v
It was found by the inventors that by introducing a point mutation at position H100A of the amino acid sequence of OKT3, the stability increases several-fold. This point mutation concerns replacement of cysteine with another polar amino acid, preferably serine, in the amino acid sequence of OKT3.

mRNA from freshly subcloned hybridoma cells of OKT3 is used as point of departure in producing an antibody according to the invention. The cDNA is produced according to methods known to one skilled in the art, which were described, for example, in Dubel et al., J. Immunol. Methods **175**, pp. 89-95 (1994). The DNA that codes for the variable domains of the light chain can be prepared by PCR, using appropriate primers, for example, by means of the primers Bi5 and Bi8, which hybridize on the amino terminal part of the constant domains of the κ -chain and the "framework 1 (FR1)" region of the variable domains of the κ -chain (Dubel et al., cf. aforementioned). For amplification of DNA that codes for the variable domains of the heavy chain, the primer Bi4 can be used, which hybridizes on the amino terminal part of the constant domain 1 of the γ -chain (Dubel et al., cf. aforementioned) and the primer Bi3f, which hybridizes on the FR1 region of the heavy chain (Gotter et al., Tumor Targeting **1**, pp. 107-114 (1995).

The amplified DNA is then inserted into a vector appropriate for sequencing and for site-specific mutagenesis, as are best known to one skilled in the art. For example, the vector pCR script SK(+) marketed by the Stratagene Co. can be used. Mutations are introduced in the v_H domains originating from OKT3 by directed mutagenesis (site-specific mutagenesis). The conditions required for this are known to one skilled in the art and are also described in Kunkel et al., Meth. Enzymol. **154**, pp. 367-382 (1987). The amino acid substitution at position H100A of OKT3 (replacement of cysteine) is appropriately conducted using the primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC, if replacement with serine is to be carried out in this position.

The DNA so altered can then be cloned into a vector or expression vector. Examples of this are known to one skilled in the art. In the case of an expression vector, these are pGEMEX, pUC derivatives or pET3b. pY100 and Ycpad 1 can be mentioned for expression in yeast, whereas pKCR, pEFBOX, cDMB and pCEV4 can be mentioned for expression in animal cells. The baculovirus expression vector pAcSGHisNT-1 is particularly suited for expression in insect cells. Expression in *E. coli* is preferred according to the invention, for which purpose the vector pHOG21 shown in Figure 1 is preferably used (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods **196** pp. 51-62 (1996), in which the mutated OKT3 single chain (scFv) gene is inserted as an NcoI/BamHI DNA fragment. Expression of a mutated single-chain antibody OKT3 in position 100A (Kabat numbering system) occurs, which has the sequence depicted in Figure 2.

One skilled in the art is familiar with appropriate cells in order to express DNA present in an expression vector. Examples of such cells include the *E. coli* strains HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, Bi21 and SG 13009, the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* and the animal cells 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero and Hela, as well as the insect cells sf9. Use of the XL1 Blue *E. coli* cells marketed by the Stratagene Co. is preferred.

One skilled in the art knows how a DNA must be inserted into an expression vector. He also knows that this DNA can be inserted in conjunction with a protein or peptide that codes for another protein so that the DNA can be expressed in the form of a fusion protein, for example, in the form of an His fusion protein. The information required for this is contained in the preferably employed plasmid pHOG21. The mutated form of OKT3 can also be present in the form of a bispecific antibody, for example, in conjunction with an antibody against the human CD19 complex. The sequence of such a bispecific antibody is shown in Figure 3.

Antibodies according to the invention are characterized by the fact that they can be prepared by recombinant methods in sufficient amounts and have greater stability in

comparison with unmutated monoclonal antibodies OKT3. This manifests itself in the fact that the mutated antibodies even after a month of storage at 4°C in PBS have still hardly lost any of their original binding affinity, whereas OKT3 under the same conditions have already significantly lost binding affinity (46%). The antibody according to the invention also enjoys the advantage that it has a more rapid blood clearance and better tumor penetration as a single chain antibody (scFv). ScFvs are also very useful molecules in order to bring drugs, toxins or radionuclides to tumor sites, which is important in tumor diagnosis and therapy.

The present invention is described below with reference to figures.

Figure 1: Plasmid pHOG21

in which the employed abbreviations have the following meanings:

Ap^R: ampicillin resistance gene

c-myc: sequence that codes for an epitope recognized by the monoclonal antibody 9E10 (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, Great Britain)

ColE1: origin of DNA replication

f1 IG: intergene region of the f1 phages

His₆: sequence that codes for 6 histidine residues

linker: sequence that codes for 17 amino acids that join the v_H and v_L domains

peiB: signal peptide sequence for bacterial pectate lyase

P/O: wild type lac promoter/operator

Figure 2: Nucleotide and derived amino acid sequence of the mutated OKT3 single chain antibody.

Figure 3: Bispecific antibodies assembled from mutated OKT3 and anti-CD19.

The invention is further explained by means of an example.

Example 1: Preparation of an antibody according to the invention

Isolation of mRNA from freshly subcloned hybridoma cells of OKT3 and cDNA synthesis was carried out as described in Dubel et al., *J. Immunol. Methods* **175**, pp. 89-95 (1994). The DNA that codes for the variable domains of the light chain was produced by PCR using the primers Bi5 and Bi8, which hybridize on the amino terminal part of the constant domains of the κ -chain and the framework 1 (FR1) region of the variable domains of the κ -chain (Dubel et al., cf. aforementioned). For amplification of DNA that codes for the variable domains of the heavy chain, the primer Bi4, which hybridizes on the amino terminal part of the constant domain 1 of the γ -chain (Dubel et al., cf. aforementioned) and the primer Bi3f, which hybridizes on the FR1 region of the heavy chain (Gotter et al., *Tumor Targeting* **1**, pp. 107-114 (1995) were used. The 50 μ L reaction mixture contains 10 pmol of each primer and 50 ng hybridoma cDNA, 100 μ M of each of the dNTPs, 1 \times vent buffer (Boehringer Mannheim), 5 μ g BSA and 1 U of vent DNA polymerase. Thirty cycles of 1 minute each were run at 95°C, 1 minute at 55°C and 2 minutes at 75°C in a PCR thermocycler. The amplified DNA was purified with a QiA quick PCR purification kit (Qiagen, Hilden).

The amplified DNA was then blunt-end ligated in the vector pCR script SK(+) marketed by the Stratagene Co., which was cleaved with the restriction enzyme SrfI. Mutations were introduced into the v_H domains originating from OKT3 by directed mutagenesis (site specific mutagenesis) (Kunkel et al., *Meth. Enzymol.* **154**, pp. 367-382 (1987)). The amino acid substitution in position H100A of OKT3 (replacement of cysteine with serine) was carried out using the primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAA TGATCATC.

The vector pHOG21 shown in Figure 1 was used for expression of the obtained mutated DNA (Kipriyanov et al., *J. Immunol. Methods* **196**, pp. 51-62 (1996)) i which

the mutated OKT3 single cell (scFv) gene is inserted as an NcoI/BamHI DNA fragment. XL1-Blue *E. coli* cells (Stratagene) were transformed with this expression vector and allowed to grow overnight in 2xYT medium with 50 µg/mL ampicillin and 100 mM glucose (2xYT_{GA}) at 37°C. Dilutions (1:50) of the overnight cultures in 2xYT_{GA} were allowed to grow at 37°C during shaking at 37°C. As soon as the cultures reached OD₆₀₀ = 0.8, the bacterial were pelletized by centrifuging at 1500 g for 10 minutes and at 20°C and resuspended in equal volumes of fresh 2xYT medium containing 50 µg/mL ampicillin and 0.4M sucrose. IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM and growth continued at room temperature for 20 hours. After centrifuging at 5000 g for 10 minutes at 4°C, the cells were harvested. The culture supernatant was stored on ice. To isolate soluble periplasmatic proteins, the pelletized bacteria were taken up in ice cold 50 mM Tris-HCl, 20% sucrose, 1 mM EDTA, pH 8.0 (5% of the original volume). After an hour of incubation on ice with occasional agitation spheroplasts were centrifuged off at 30,000 g for 30 minutes and 4°C, in which the soluble periplasmatic extract formed as supernatant and the spheroplasts plus insoluble periplasmatic material as pellet. The culture supernatant stored beforehand on ice and the soluble periplasmatic extract were combined and clarified by additional centrifuging (30,000 g, 4°C, 40 minutes). After filtration through glass filters with a pore size of 10-16 µm and then 0.2 µm, the volume was reduced 10-fold by concentration with Amicon YM10 (Amicon, Witten). The concentrated supernatant was clarified by centrifuging and dialyzed versus 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 7.0 at 4°C. Immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) was carried out at 4°C using a 5 mL column of chelating sepharose (Pharmacia) loaded with Ni²⁺ and equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 7.0 (start buffer). Material adsorbed on the column was eluted with 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 250 mM imidazole, pH 7.0. After a buffer change to 50 mM MES, pH 6.0, the protein was purified further on a Mono S ion exchange column (Pharmacia). The scFV antibody purified according to the invention was dialyzed in PBS (15 mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, pH 7.4). For longer storage the antibody was frozen in the presence of BSA (final concentration 10 mg/mL) and stored at -80°C.

Claims

- 1) Monoclonal antibody characterized by replacement of cysteine with another polar amino acid in position H100A of the antibody known under the name OKT3.
- 2) Monoclonal antibody characterized by the fact that the polar amino acid serine.
- 3) Monoclonal antibody according to Claim 1 or 2 characterized by the fact that it has the sequence shown in Figure 2.
- 4) Method for production of the monoclonal antibody according to one of the Claims 1 to 3 characterized by the following steps:
 - a) Recovery of mRNA from freshly subcloned hybridoma cells of OKT3 and rewriting to cDNA,
 - b) Amplification of the DNA that codes to the variable domains of the light and heavy chains by means of PCR using appropriate primers,
 - c) Cloning of the DNA obtained under b) into a vector appropriate for directed mutagenesis, as well as introduction of the design mutation using appropriate primers,
 - d) Insertion of the mutated DNA obtained under c) in an expression vector and expression in an appropriate expression system.
- 5) Method according to Claim 4, in which the primers used in step b) are Bi5, Bi8, Bi4 and Bi3f.

- 6) Method according to Claim 4 or 5, in which the vector used in step c) is pCR script SK(+).
- 7) Method according to one of the Claims 4 to 6, in which the primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC is used in step c).
- 8) Method according to one of the Claims 4 to 7, in which expression vector used in step d) is pHOG21.
- 9) Method according to one of the Claims 4 to 8, in which expression occurs in XL1-Blue *E. coli* cells.
- 10) Use of the monoclonal antibody according to one of the Claims 1 to 3 to reduce or eliminate transplant rejection by an organ transplant recipient.
- 11) Use of the monoclonal antibody according to one of the Claims 1 to 3 in tumor diagnosis or therapy.

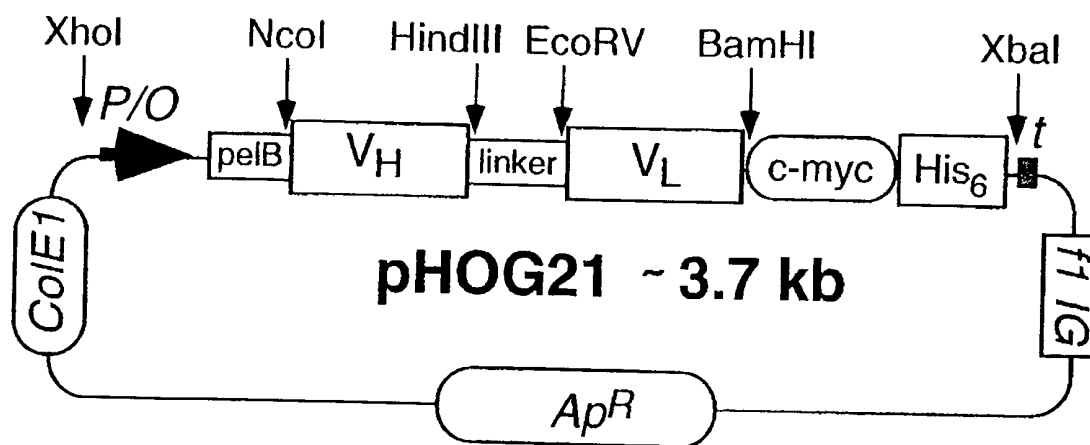


Fig. 1

EcoRI RBS PelB leader
 131 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCT
 1 M K Y L L P T A A A G
 PstI
 NcoI PvuII VH anti-CD3
 192 TGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAA
 12 L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E
 Frame-H1
 254 CTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAG
 33 L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T R
 CDR-H1 Frame-H2
 316 GTACACGATGCACCTGGGTAAACAGAGGCTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATACA
 53 Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y
 CDR-H2
 375 TTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAAGTTCAAGGACAAGGCCA
 73 I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A
 Frame-H3
 429 CATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCAGCAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAG
 91 T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E
 PstI CDR-H3
 491 GACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTAC
 112 D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y
 Frame-H4 CH1 HindIII Yol linker
 548 TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCAGCTTGAPGACGG
 131 W G Q G T T L T V S S A K T T P K L E E G
 EcoRV
 MluI VL anti-CD3 Frame-L1
 610 TGAATTTTCAGAAGCAGCGGTAGATATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT
 151 E F S E A R V D I V L T Q S P A I M S A
 PstI CDR-L1
 672 CTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGA
 172 S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M
 Frame-L2 CDR-L2
 729 ACTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAAA
 191 N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K
 Frame-L3
 788 CTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTC
 211 L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L
 CDR-L3
 848 ACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAG
 231 T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S
 Frame-L4 C kappa
 907 TAACCCATTTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGCAAATAAACCGGGCTGATACTGCACC
 250 N P F T F G S G T K L E I N R A D T A P
 BamHI c-myc epitope His6 tail
 967 AACTGGATCCGACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATC
 270 T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H
 XbaI
 1029 ACTAATCTAGA
 291 H .

Fig. 2

EcoRI RBS PelB leader
 1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTG
 1 M K Y L L P T A A G L L
 NcoI ♦ VH anti-CD3 Frame-H1
 67 CTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGAC
 14 L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L A R
 CDR-H1
 134 CTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCA
 36 P G A S V K M S C K A S G Y T F T R Y T M H
 Frame-H2 CDR-H2
 198 CTGGGTAAACAGAGGCCTCGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGG
 57 W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G
 Frame-H3
 261 TTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCA
 78 Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S
 323 GCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATA
 99 S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y
 CDR-H3 Frame-H4
 390 TTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAG
 121 Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L T V S S
 CH1 Linker VL anti-CD19 Frame-L1
 452 CCAAAACAACACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCTTCTCACCCAAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTG
 142 A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V
 CDR-L1
 517 TCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGA
 164 S L G Q R A T I S C K A S Q S V D Y D G D
 Frame-L2
 579 TAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCA
 184 S Y L N W Y Q Q I P G Q P P K L L I Y D A
 CDR-L2 Frame-L3
 643 TCCAATCTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCC
 206 S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F T
 CDR-L3
 707 TCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAGTACTGAGGA
 227 L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D
 Frame-L4 C kappa NotI
 771 TCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTGCGGCCGCTGGATCC
 248 P W T F G G G T K L E I K R A D A A A G S
 c-myc epitope His6 tail BgIII
 838 GAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCAAGAT
 271 E Q K L I S E E D L N S H H H H H H .
 899 CT

Fig. 3

BgIII RBS Pel B leader
1 AGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGC
1► M K Y L L P T A A A G L
Ncol ♦ VH anti-CD19 Frame-H1
65 TGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGT
13► L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V
CDR-H1
129 GAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTG
34► R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W
Frame-H2
192 GATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGCCCT
55► M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W P
CDR-H2
253 GGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCA
75► G D G D T N Y N G K F K G K A T I T A
Frame-H3
310 GACGAATCCTCCAGCACAGCCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCT
95► D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V
CDR-H3
374 ATTTCTGTGCAAGACGGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACT
116► Y F C A R R E T T V G R Y Y Y A M D
Frame-H4 CH1 Linker
431 ACTGGGGTCAAGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCAGCCAAAACAACACCCAAGCTTGGCGGT
135► Y W G Q G T S V T V S S A K T T F K L G G
VL anti-CD3 Frame-L1
493 GATATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGA
156► D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M
CDR-L1 Frame-L2
557 CCTGCCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAACTTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACC
177► T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T
CDR-L2
615 TCCCCCAAAGATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTTGGAGTCCCTGCTCACTTC
197► S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F
Frame-L3
676 AGGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTG
217► R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A
CDR-L3 Frame-L4
740 CCACCTTATTACTGCCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAG
238► A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K
C kappa c-myc epitope
799 TTGGAAATAAACCGGGCTGATACTGCACCAACTGGATCCGAACAAAAAGCTGATCTCAGAA
258► L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S E
His6 tail XbaI
859 GAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA
278► E D L N S H H H H H H H .

Fig. 3 (Fortsetzung)

(continued)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/574		Int. Application No. PCT/DE 98/01409
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity." PROTEIN ENGINEERING, vol. 10, no. 4, April 1997, pages 445-453. XP002079905 Oxford, GB see the whole document --- -/--	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 October 1998		Date of mailing of the international search report 21/10/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nooij, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ernational Application No

PCT/DE 98/01409

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 196, no. 1, 13 September 1996, pages 51-62, XP002079906 Amsterdam, NL cited in the application see "Material & Methods" ---	1-11
A	S. DÜPEL ET AL.: "Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 175, no. 1, 30 September 1994, pages 89-95, XP002079907 Amsterdam, NL cited in the application see tables ---	1-11
A	WO 94 29350 A (THE GOVERNMENT OF THE U.S.A.) 22 December 1994 see table 8 see claims ---	1-11
A	WO 94 28027 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 8 December 1994 see the whole document ---	1-11
A	D. KROON ET AL.: "Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping." PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 9, no. 11, November 1992, pages 1386-1393, XP002079908 Stuttgart, Deutschland see the whole document -----	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE98/01409

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See Additional Matter PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE98/01409

Although Claims 10 (fully) and 11 (in part) relate to a method for treatment of the human or animal body, and although Claim 11 (in part) relates to a diagnostic method which is carried out on the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/DE 98/01409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429350 A	22-12-1994	US 5747654 A	05-05-1998
		AT 169932 T	15-09-1998
		AU 682705 B	16-10-1997
		AU 7246494 A	03-01-1995
		CA 2164984 A	22-12-1994
		DE 69412614 D	24-09-1998
		EP 0703926 A	03-04-1996
		JP 9502862 T	25-03-1997
WO 9428027 A	08-12-1994	AU 7098094 A	20-12-1994
		CA 2163989 A	08-12-1994
		EP 0700402 A	13-03-1996
		JP 9501824 T	25-02-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/577, 33/574</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/52975</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. November 1998 (26.11.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01409</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Mai 1998 (22.05.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 21 700.1 23. Mai 1997 (23.05.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergey [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE). MOLDENHAUER, Gerhard [DE/DE]; Brückenstrasse 41, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schößler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: MUTATED OKT3 ANTIBODY</p> <p>(54) Bezeichnung: MUTIERTER OKT3-ANTIKÖRPER</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="padding-left: 20px;">The invention relates to an H100A position point-mutated OKT3 antibody, and to a method for the production and use thereof.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="padding-left: 20px;">Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Mutierter OKT3-Antikörper

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine
5 Verwendung.

OKT3 ist ein aus Maus stammender monoklonaler Antikörper vom IgG 2a-Typ, der ein Epitop einer ϵ -Untereinheit des menschlichen CD3-Komplexes erkennt (Kung et al., Science 206, S. 347-349 (1979); Van Wauwe et al., J. Immunol. 124, S. 2708-2713 (1980); Transy et al., Eur. J. Immunol. 19, S. 947-950 (1989)). Das Verfahren, den monoklonalen Antikörper aus dem entsprechenden Hybridom zu erhalten, ist in diesen Druckschriften im Detail beschrieben. Außer-
dem wurde die OKT3 produzierende Hybridomazelllinie am 26. April 1979 unter der ATCC-Nummer CRL 8001 bei der American Type Culture Collection, 12301
15 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 von der Inhaberin des EP-Patents 0 018 795 hinterlegt. OKT3 wird seit langem benutzt, um eine T-Zellantwort zu unterdrücken und dadurch die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern (Thistlethwaite et al., Transplantation 38, S. 695-701 (1984); Woodle et al., Transplantation 51, S. 1207-1212 (1991)). Andererseits kann durch OKT3 auch eine
20 T-Zell-Aktivierung und Proliferation ausgelöst werden, die Effektorzellen anregt, was bei der adoptiven Krebs-Immuntherapie eingesetzt werden kann (Yannelly et al., J. Immunol. Meth. 1, S. 91-100 (1990)). OKT3 wurde sowohl alleine als auch als Komponente eines bispezifischen Antikörpers eingesetzt, um cytotoxische T-Lymphozyten gegen Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zu richten
25 (Nitta et al., Lancet 335, S. 368-376 (1990); Sanna et al., Bio/Technology 13, S. 1221-1224 (1995)). Außerdem sind auch humanisierte Versionen des OKT3-monoklonalen Antikörpers, die in COS-Zellen exprimiert wurden, bekannt (Woodle et al., J. Immunol. 148, S. 2756-2763 (1992); Adair et al., Human. Antibod. Hybridomas, S. 41-47 (1994)). Bisher bestand aber das Problem, daß OKT3
30 keine ausreichende Stabilität aufweist und insbesondere sich nicht in bekannten

rekombinanten Expressionssystemen stabil und in genügender Menge exprimieren läßt.

5 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, OKT3 rekombinant zu exprimieren und einen Antikörper zu erhalten, der eine befriedigende Stabilität aufweist.

Die Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

10 Von den Erfindern wurde gefunden, daß durch Einbringen einer Punktmutation an Position H100A der Aminosäuresequenz von OKT3 die Stabilität um ein Vielfaches zunimmt. Diese Punktmutation betrifft den Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure, bevorzugt Serin, in der Aminosäuresequenz von OKT3.

15 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers wird von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 ausgegangen. Die cDNA wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden, die beispielsweise in Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994) beschrieben wurden, hergestellt. Die
20 für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA kann mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer, z.B. mittels der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ -Kette hybridisieren, hergestellt werden (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die
25 variable Domäne der schweren Kette codiert, können beispielsweise der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet werden.

30 Die amplifizierte DNA wird danach in einen für die Sequenzierung und für "site-specific mutagenesis" geeigneten Vektor, wie er dem Fachmann bestens be-

kannt sind, inseriert. Beispielsweise kann der von der Firma Stratagene vertriebene Vektor pCR-Skript SK(+) verwendet werden. Mutationen werden in der von OKT3 stammenden v_H -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht. Die dafür notwendigen Bedingungen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise auch in Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987) beschrieben. Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein) wird geeigneterweise unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt, falls ein Austausch gegen Serin an dieser Position ausgeführt werden soll.

Die so veränderte DNA kann danach in einen Vektor bzw. Expressionsvektor kloniert werden. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors sind dies pGEMEX, pUC-Derivate oder pET3b. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad 1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugegeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-1. Die Expression in E. coli ist erfindungsgemäß bevorzugt, wofür vorzugsweise der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt wird, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als NcoI/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. Es kommt zur Expression eines an der Position 100 A (Kabat-Nummerierungssystem) mutierten einzelkettigen Antikörpers OKT3, der die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aufweist.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E. coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BI21 und SG 13009, den Hefestamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und Hela sowie die Insektenzellen sf9. Bevorzugt ist die Verwendung der von der Firma Stratagene vertriebenen XL1-Blue E. coli-Zellen.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine DNA in einen Expressionsvektor

inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden inseriert werden kann, so daß die DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann, beispielsweise in Form eines His-Fusionsproteins. Die dafür notwendige Information ist im vorzugsweise verwendeten Plasmid pHOG21 enthalten. Weiter kann die mutierte Form von OKT3 in Form eines bispezifischen Antikörpers, z.B. in Verbindung mit einem Antikörper gegen menschlichen CD19-Komplex vorliegen. Die Sequenz eines solchen bispezifischen Antikörpers ist in Fig. 3 gezeigt.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie mittels rekombinanter Methoden in ausreichender Menge hergestellt werden können und eine im Vergleich zum unmutierten monoklonalen Antikörper OKT3 größere Stabilität aufweist. Diese äußert sich beispielsweise darin, daß der mutierte Antikörper auch noch nach einem Monat Lagerung bei 4°C in PBS kaum von seiner ursprünglichen Bindungsaffinität eingebüßt hat, wohingegen OKT3 unter diesen Bedingungen bereits deutlich an Bindungsaffinität verloren hat (46%). Außerdem hat der erfindungsgemäße Antikörper den Vorteil, daß er als Einzelkettenantikörper (scFv) eine schnellere Blut-Clearance und eine bessere Tumورpenetration aufweist. Weiter sind ScFv's sehr nützliche Moleküle, um Arzneistoffe, Toxine oder Radionuklide an Tumorstellen zu bringen, was in der Tumordiagnostik und -therapie wichtig ist.

Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

Fig. 1: Plasmid pHOG21

wobei die verwendeten Abkürzungen folgende Bedeutungen haben:

Ap ^R :	Ampicillin-Resistenzgen
c-myc:	Sequenz codierend für ein Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper 9E10 (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, Großbritannien) erkannt wird
ColE1:	Ursprung der DNA-Replikation

fl IG:	Intergene Region des f1-Phagen
His ₆ :	Sequenz codierend für 6 Histidinreste
linker:	Sequenz codierend für 17 Aminosäuren, die die v _H - und v _L -Domäne verbindet
pelB:	Signalpeptidsequenz für bakterielle Pektatlyase
P/O:	Wildtyp-Lac-Promotor/Operator

Fig. 2: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mutierten OKT3-Einzelkettenantikörpers

Fig. 3: Bispezifischer Antikörper zusammengesetzt aus mutiertem OKT3 und anti-CD19

Die Erfindung wird weiter anhand des Beispiels erläutert.

BEISPIEL 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Die Isololation von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und die cDNA-Synthese wurde, wie in "Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994)" beschrieben durchgeführt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ -Kette hybridisieren, hergestellt (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, wurde der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet. Das 50 μ l Reaktionsgemisch enthielt 10 pmol jedes Primers und 50 ng Hybridoma cDNA, 100 μ M jedes der dNTPs, 1x Vent-Puffer (Boehringer Mannheim), 5 μ g BSA und 1 U Vent DNA-Polymerase. Es wurden 30 Zyklen

je 1 Minute bei 95°C, 1 Min. bei 55°C und 2 Minuten bei 75°C in einem PCR-Thermozykler durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit einem QIA-quick PCR-Reinigungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

- 5 Die amplifizierte DNA wurde danach in den von der Firma Stratagene vertriebenen Vektor pCR-Skript SK(+), der mit dem Restriktionsenzym SrfI geschnitten worden war, "blunt-end" ligiert. Mutationen wurden in der von OKT3 stammenden v_H -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht (Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987)). Die
10 Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein gegen Serin) wurde unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGT-CAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt.

- Für die Expression der erhaltenen mutierten DNA wurde der in Fig.1 gezeigte
15 Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996)) eingesetzt, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als NcoI/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. XL1-Blue E. coli-Zellen (Stratagene) wurden mit diesem Expressionsvektor transformiert und über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C wachsgelassen.
20 Verdünnungen (1:50) der Übernachtskulturen in 2xYT_{GA} wurden bei 37°C unter Schütteln bei 37°C wachsgelassen. Sobald die Kulturen OD₆₀₀ = 0,8 erreichten, wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 1500 g für 10 Minuten und 20°C pelletiert und im gleichen Volumen frischem 2xYT-Medium enthaltend 50 μ g/ml Ampicillin und 0,4 M Sucrose resuspendiert. Es wurde IPTG auf eine
25 Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt und das Wachstum bei Raumtemperatur für 20 Std. fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000g für 10 Minuten und 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde auf Eis aufbewahrt. Um lösliche periplasmatische Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, 20% Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8,0 (5%
30 des Ursprungsvolumens) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Rühren wurden Spheroplasten bei 30000 g für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Über-

stand und die Spheroplasten plus unlösliches periplasmatisches Material als Pellet anfielen. Der vorstehend auf Eis aufbewahrte Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden kombiniert und durch eine zusätzliche Zentrifugation (30000 g, 4°C, 40 Min.) geklärt. Nach Filtrationen durch Glasfilter mit einer Porengröße von 10-16 μm und dann 0,2 μm wurde das Volumen 10-fach durch Konzentration mit Amicon YM10 Membranen (Amicon, Witten). Der konzentrierte Überstand wurde durch Zentrifugation geklärt und gegen 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 bei 4°C dialysiert. Immobilisierte Metall-Affinitätschromatografie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule von chelatisierender Sepharose (Pharmacia) beladen mit Ni^{2+} und equilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) durchgeführt. Auf der Säule adsorbiertes Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0 eluiert. Nach Pufferwechsel zu 50 mM MES, pH 6,0 wurde das Protein weiter auf einer Mono S Ionenaustauschsäule (Pharmacia) gereinigt. Der erfindungsgemäße gereinigte scFv-Antikörper wurde in PBS (15 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) dialysiert. Für eine längere Aufbewahrung wurde der Antikörper in Anwesenheit von BSA (Endkonzentration 10 mg/ml) eingefroren und bei -80°C gelagert.

Patentansprüche

5

1) Monoklonaler Antikörper gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.

10

2) Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.

3) Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.

15

4) Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

20

a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA

25

b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,

c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,

30

d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.

- 5) Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.
- 5 6) Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.
- 7) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.
- 10 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.
- 15 10) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen Organtransplantatempfänger.
- 20 11) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der Tumordiagnostik oder -therapie.

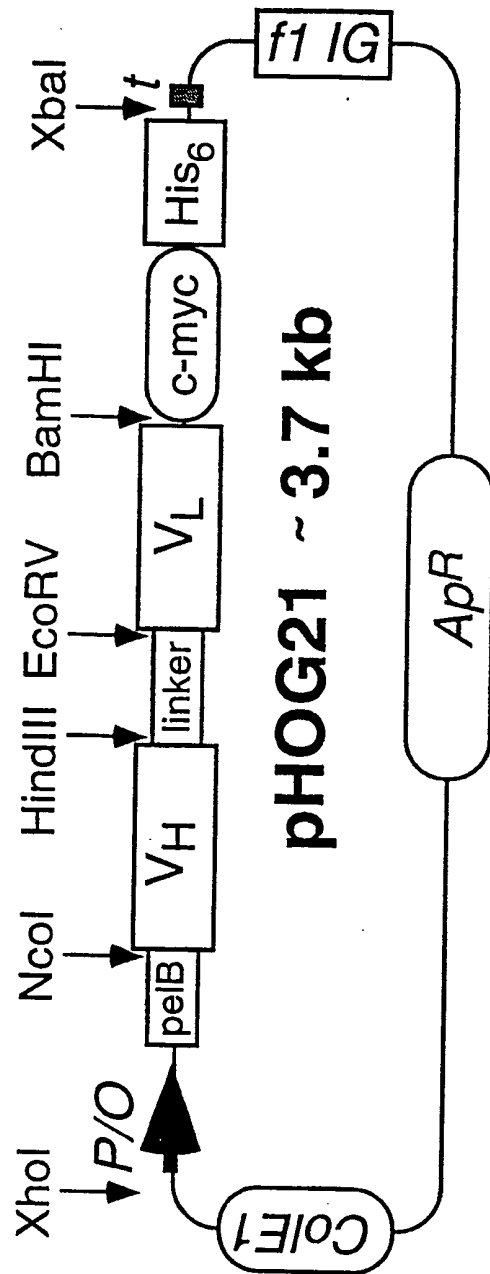


Fig. 1

EcoRI RBS PelB leader
 131 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCT
 1► M K Y L L P T A A A G
 PstI
 192 TGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAA
 12► L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E
 NcoI ♦ PvuII VH anti-CD3
 Frame-H1
 254 CTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAG
 33► L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T R
 CDR-H1 Frame-H2
 316 GTACACGATGCACCTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACA
 53► Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y
 CDR-H2
 375 TTAATCCTAGCCGTTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCA
 73► I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A
 Frame-H3
 429 CATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAG
 91► T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E
 PstI CDR-H3
 491 GACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTAC
 112► D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y
 Frame-H4 CH1 HindIII Yol linker
 548 TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCAACTTGAAGAAGG
 131► W G Q G T T L T V S S A K T T P K L E E G
 EcoRV
 MluI VL anti-CD3 Frame-L1
 610 TGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGATATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT
 151► E F S E A R V D I V L T Q S P A I M S A
 PstI CDR-L1
 672 CTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGA
 172► S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M
 Frame-L2 CDR-L2
 729 ACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAA
 191► N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K
 Frame-L3
 788 CTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTC
 211► L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L
 CDR-L3
 848 ACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAG
 231► T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S
 Frame-L4 C kappa
 907 TAACCCATTACAGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATACTGCACC
 250► N P F T F G S G T K L E I N R A D T A P
 BamHI c-myc epitope His6 tail
 967 AACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATC
 270► T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H
 XbaI
 1029 ACTAATCTAGA
 291► H .

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 3 (Fortsetzung)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.

PCT/DE 98/01409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
----------	--	-----------------------

X	<p>S. KIPRIYANOV ET AL.: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity." PROTEIN ENGINEERING, vol. 10, no. 4, April 1997, pages 445-453. XP002079905 Oxford, GB see the whole document</p>	1-11
---	--	------

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 1998

Date of mailing of the international search report

21/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No

PCT/DE 98/01409

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>S. KIPRIYANOV ET AL.: "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 196, no. 1, 13 September 1996, pages 51-62, XP002079906 Amsterdam, NL cited in the application see "Material & Methods"</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
A	<p>S. DÜPEL ET AL.: "Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 175, no. 1, 30 September 1994, pages 89-95, XP002079907 Amsterdam, NL cited in the application see tables</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
A	<p>WO 94 29350 A (THE GOVERNMENT OF THE U.S.A.) 22 December 1994 see table 8 see claims</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
A	<p>WO 94 28027 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 8 December 1994 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11
A	<p>D. KROON ET AL.: "Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping." PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 9, no. 11, November 1992, pages 1386-1393, XP002079908 Stuttgart, Deutschland see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE98/01409

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See Additional Matter PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE98/01409

Although Claims 10 (fully) and 11 (in part) relate to a method for treatment of the human or animal body, and although Claim 11 (in part) relates to a diagnostic method which is carried out on the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/01409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429350 A	22-12-1994	US 5747654 A	05-05-1998
		AT 169932 T	15-09-1998
		AU 682705 B	16-10-1997
		AU 7246494 A	03-01-1995
		CA 2164984 A	22-12-1994
		DE 69412614 D	24-09-1998
		EP 0703926 A	03-04-1996
		JP 9502862 T	25-03-1997
WO 9428027 A	08-12-1994	AU 7098094 A	20-12-1994
		CA 2163989 A	08-12-1994
		EP 0700402 A	13-03-1996
		JP 9501824 T	25-02-1997

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity." PROTEIN ENGINEERING, Bd. 10, Nr. 4, April 1997, Seiten 445-453, XP002079905 Oxford, GB siehe das ganze Dokument --- -/-	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Oktober 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/10/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>S. KIPRIYANOV ET AL.: "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Bd. 196, Nr. 1, 13. September 1996, Seiten 51-62, XP002079906 Amsterdam, NL in der Anmeldung erwähnt siehe "Material & Methods"</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>S. DÜPEL ET AL.: "Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Bd. 175, Nr. 1, 30. September 1994, Seiten 89-95, XP002079907 Amsterdam, NL in der Anmeldung erwähnt siehe Tabellen</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>WO 94 29350 A (THE GOVERNMENT OF THE U.S.A.) 22. Dezember 1994 siehe Tabelle 8 siehe Ansprüche</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>WO 94 28027 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 8. Dezember 1994 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>D. KROON ET AL.: "Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping." PHARMACEUTICAL RESEARCH, Bd. 9, Nr. 11, November 1992, Seiten 1386-1393, XP002079908 Stuttgart, Deutschland siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01409

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

siehe Weitere Angaben PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/ DE 98 /01409

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Obwohl die Ansprüche 10 (völlig) und 11 (teilweise) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, und obwohl der Anspruch 11 (teilweise) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01409

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9429350 A	22-12-1994	US 5747654 A	05-05-1998
		AT 169932 T	15-09-1998
		AU 682705 B	16-10-1997
		AU 7246494 A	03-01-1995
		CA 2164984 A	22-12-1994
		DE 69412614 D	24-09-1998
		EP 0703926 A	03-04-1996
		JP 9502862 T	25-03-1997
WO 9428027 A	08-12-1994	AU 7098094 A	20-12-1994
		CA 2163989 A	08-12-1994
		EP 0700402 A	13-03-1996
		JP 9501824 T	25-02-1997